

タンパク質と食用色素の結合に関する研究

著者	相澤 秀俊
号	183
発行年	1979
URL	http://hdl.handle.net/10097/16192

氏 名 (本籍) あい 相 ざわ 澤 ひで 秀 とし 俊

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 183 号

学位授与年月日 昭和 54 年 12 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 タンパク質と食用色素の結合に関する
研究

論文審査委員 (主 査)

教授 志村 憲助 教授 松田 和雄

教授 柴崎 一雄

論文内容要旨

I 緒 論

食用タール系色素としては、アゾ、キサントン、ピラズロンおよびトリフェニールメタン色素が主として利用されている。ところで、これらの色素は脱水素酵素や消化酵素を阻害するほか、ヒトおよびウシ血清アルブミン、ヒトグロブリンその他のタンパク質と結合し、食品学の面ではオボアルブミンおよびグロブリン、組織染色の面では胸腺ヒストン、エラスチンなどとの結合が知られている。そこで、これらの色素を摂取した場合、酵素活性に影響を与えるほか、血清アルブミンなどとの結合は体内における滞留つまり排泄の良否とも関係することが考えられる。しかし、現在までの研究では、ある特定のタンパク質と1種または数種の色素との結合を結合の可否の面より論じたものが多く、結合を色素の化学構造との関連で検討するには不十分な点が多い。

そこで、本研究では組織的に食用および関連色素を取り上げ、色素とタンパク質の結合を数値的に求め、得られたパラメーターを主体に他に若干の解析を加えて色素の化学構造と結合能および結合の機構、得られたパラメーターと有害性の関係などを知る目的で検討を行った。このほか関連問題として、色素—タンパク質複合体形成の前後におけるタンパク質の構造の問題、メタクロマジー現象の機構、複合体形成に伴う耐光性および退色の問題なども検討した。またタンパク質は主としてウシ血清アルブミンを用いたが、他に数種のタンパク質についても色素結合を検討した。

II アゾ色素とタンパク質の結合

1. 結合の様式 使用したアゾ色素はスルホン基を有する酸性色素(図1)で、タンパク質との間で塩結合に入る。これに対応するウシ血清アルブミン(BSA)上の陽荷電基としてはヒスチジン残基のイミダゾール基、リジン残基の ϵ -アミノ基およびアルギニン残基のグアニジル基が挙げられるが、グアニジル基は結合に関与しないと推定された(図2)。しかし、グアニジル基のみが陽荷電する pH 12 でも数種の色素で結合がみられ、この結合は色素の化学構造からみて疎水結合によると推定された。この点については、アゾ色素—タンパク質系とアゾ色素—有機溶媒系の差スペクトルを対比することによっても確かめた。また塩結合が結合に関与する pH 10 以下の結果から、疎水結合も結合に関与することがわかったが、エタノール添加による結合阻害の面から、色素によって疎水結合寄与の度合に差のあることがわかった。

2. 結合の自由エネルギーと最大結合数 BSA に対する第一結合色素の結合の自由エネルギー(4 G)および最大結合数を表1に示した。結合の 4 G と色素の化学構造との関係は、1) 一方の芳香環が疎水性の色素では塩、疎水両結合が協同して働き強い結合に入る。2) 両方の芳香環にスルホン基を有し塩結合に依存が強い色素では結合は1)の色素より弱い。最大結合数と色素の化学構造との関係は、1) 一方の芳香環が疎水性の場合は結合数が多い。しかし、側鎖メチル基の数は結合数に大きな影響を与える。2) 両方の芳香環にスルホン基を有する色素は結合数が少ないが、スルホン基

の位置も結合数に大きな影響を与える。

3. 結合の自由エネルギーおよび最大結合数と有害性の関係 この関係を生理的条件に近い pH 7 の結果と有害性の研究に基づいて使用禁止となった現状とを対比したのが表 2 である。この結果、1) 結合の ΔG と有害性との間にはよい相関はみられないが、使用禁止となった色素の結合の ΔG は一般に高い。2) 最大結合数と有害性はよい相関を示し、結合数の多いものは使用禁止となっている。つまり BSA に対して最大結合数 6 以下の色素が国の内外で許可され、10 以上のものは使用禁止となっている。

4. 色素結合によるタンパク質の構造変化 アゾ色素は BSA と結合して BSA を変性させる (図 3)。しかし、変性の度合は色素によって異なり、結合に際して塩結合および疎水結合の両者に依存の高い色素は、塩結合に依存の高い色素よりも変性力が強い。

また、アゾ色素は BSA に複数結合するが、結合数の増加とともに構造変化は進むと推定された (図 4)。さらに他の変性剤 (尿素) で変性させた BSA に対するアゾ色素の結合をみると、モノマーで著しく結合が促進された (図 5)。

5. 結合の順序と結合の自由エネルギー この関係は図 6 に示したように 2 つの形に分かれた。第 1 群は色素が数個結合するまでは結合の ΔG が大きく変わらない場合で、これらの色素は分子内に大きな疎水性部位を有する。第 2 群は結合数の増加とともに結合の ΔG が低下する場合で、これらの色素は結合に際して塩結合依存の度合が高い。

6. メタクロマジー発現の機構 アゾ色素-タンパク質複合体の形成によってメタクロマジーが示され、また図 7 のようにメタクロマジーの程度は色素によって強弱 2 群に分れた。しかし、これが結合の難易と必ずしも一致しなかったため、メタクロマジー発現の機構を検討した。この結果 3 つの要因からなることがわかった。1) 使用色素の多くはダイマー、モノマーの平衡状態で存在し、結合はモノマーでおこるためダイマーの減少、遊離、結合モノマーの増加で吸収は長波長側にシフトする。2) 結合した色素モノマーのスルホン基が塩結合に入ると水酸基の解離が促進されキノイド構造をとり易くなり、この結果変色がおこる。しかし両側鎖が Ortho-の関係にあると効果が大きいが、スルホン基がより離れて存在するとこの効果は小さくなる。3) 疎水結合の形成により変色する。しかし、前二者に較べると変色効果は小さい。

7. ウシ血清アルブミン以外のタンパク質との結合 BSA 同様ヒト血清アルブミンはアゾ色素との結合はよいが、オボアルブミン、カゼイン、細菌 α -アミラーゼ、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンでは一部の色素でのみ結合を示し、タンパク質によって結合に難易があった。

Ⅲ キサンテン色素とタンパク質の結合

キサンテン色素として図 8 に示したハロゲン置換体 4 種につき、主として結合に対するハロゲンの

効果をⅡに準じて検討した。

1. 結合の様式およびメタクロマジー キサンテン色素とタンパク質の結合には、塩結合とともに、側鎖ハロゲンとタンパク質上の疎水基との結合が関与し、特にテトラクロールを有する色素では、後者の結合の寄与が大きいことが明らかになった。またテトラクロールを欠く色素の場合は塩結合依存の度合が増し、この力の協力がなくては殆んど結合ができなかった（図9）。それ故、アゾ色素の場合と同様アルギニン残基のグアニジル基は結合に関与しないと推定された。しかし、グアニジル基以外の陽荷電基の存在下では、結合に強弱の差はあってもいずれの色素も2つの力が協同して働く。この事実は、キサンテン色素—タンパク質系とキサンテン色素—有機溶媒系またはキサンテン色素バリウム塩の差スペクトルの対比からもこれを確かめたが、メタクロマジーも塩結合および側鎖ハロゲンとタンパク質上の疎水基間の結合の結果おこる。

また、キサンテン色素の結合にタンパク質上の疎水基が重要であることがわかったので、有機溶媒（含水ブタノールおよびn-オクタノール）に対する親和性を分配係数の点で検討した（図10）。この結果、短い炭素鎖（ブタノール）に対してはヨード置換体はブローム置換体より親和性が高く、より長い炭素鎖（n-オクタノール）に対してはテトラクロール附加の寄与がみられた。またBSAに対するキサンテン色素の最大結合数はn-オクタノールに対する分配の傾向に近かった。さらにエタノール添加による結合阻害の結果から、結合に際して疎水基依存の高いテトラクロール置換体で阻害の度合が大きかった（図11）。

2. 結合の自由エネルギーと最大結合数 結合の ΔG は多くは $-7,000 \sim -8,000$ カロリー台にあってアゾ色素より強い結合に入った。また結合に対するハロゲンの効果をみると、テトラクロールの附加は結合の ΔG を低下させるが最大結合数を増した。さらに色素をヨードまたはブローム置換体でみると、前者で最大結合数が多かった（表3）。つまりハロゲンの種類による結合に対する効果は結合サイトの決定に重要で、この効果は $I > Br > Cl$ の順で、原子半径の大きいもの程この効果があった。

3. 色素結合によるタンパク質の構造変化 この関係はテトラクロールを欠き結合が塩結合および側鎖ハロゲンと疎水基間の結合が協同して働く色素で強く、後者の結合力が主に働くテトラクロール置換体で弱かった。これは2つの力が協同して働く場合に変性力が強いアゾ色素の結果と類似していた。

4. 結合の順序と結合の自由エネルギー テトラクロール置換体では第3結合色素（pH 5.2）までは結合の ΔG に大差がみられないかまたは差が小さかった。しかし、これを欠く色素では結合数の増加とともに結合の ΔG は大きく減少し、塩結合依存の度合の強いことを示した。また前者では、結合数の増加とともに一度低下した結合の ΔG が再び上昇する点がみられた（図12）。これはタンパク質が色素の結合によって誘導的に構造変化をきたし、この結果内部に存在した疎水基が色素と結

合可能になったためと考えられる。

5. 色素—タンパク質複合体形成と耐光性 キサンテン色素は、色素単独では、ブローム置換体はヨード置換体より耐光性があるが全般的には耐光性はよくない。ところが、タンパク質と複合体を形成すると、色素の耐光性が増加し脱ハロゲン作用が妨げられることがわかった（図13）。

6. ウシ血清アルブミン以外のタンパク質との結合 オボアルブミン、カゼイン、インゲン豆ファゼオリン、トリプシン、細菌 α -アミラーゼなどとの結合を検討したが、タンパク質によって可成り差異がみられた。

Ⅳ ピラゾロンおよびトリフェニールメタン色素とタンパク質の結合

ピラゾロン色素2種、トリフェニールメタン色素5種（図14）についてⅡに準じて検討を行った。

1. 結合の様式 タンパク質に対する両系統の色素の結合は塩結合および疎水結合によるが、アルギニン残基のグアニジル基は他の色素の場合と同様塩結合に関与しない。またBSAはpH7～9の間で構造変化をすることが知られているが、トリフェニールメタン色素の一部はこの変化に対応して結合数を増した（図15）。このような事実はBSAに関しては他の色素ではみられなかった。

2. 結合の自由エネルギーと最大結合数および有害性との関係 結合の ΔG は多くは-6,000カロリー台にあった。これはキサンテン色素より低いが、アゾ色素とは大差ないか僅かに低い程度であった。最大結合数は1～20の間にあり、一部の色素では上記1の理由でpH8.9で大きな値を示した（表4）。またトリフェニールメタン色素はフェニール基上の側鎖の有無、種類、位置などが僅かに異なるのみであるが、この差異がタンパク質との結合特に結合サイトの決定に重要な役割を示した。またアゾ色素の場合と同様、最大結合数の多い色素は食用として望ましくない。

3. 色素結合によるタンパク質の構造変化 両系統の色素はBSAその他のタンパク質と結合して構造変化をおこすと推定された。

4. メタクロマジーおよび退色 メタクロマジーはダイマーを形成するアンドパイオレットを除くと弱く、僅かに変色を示す色素の場合は疎水結合に依存すると推定された。

また、トリフェニールメタン色素は塩基性域で退色を示すが、タンパク質との複合体の形成によって一部の色素は中性域でも退色した。この退色は色素のフェニール基上の側鎖の状態によって異なるため、中心炭素に対する水酸基の附加の難易に原因があり、複合体形成による退色の促進は水酸基の附加が容易になるためと考えた。

5. ウシ血清アルブミン以外のタンパク質との結合 トリフェニールメタン色素はヒト血清アルブミン、トリプシン、キモトリプシン、細菌 α -アミラーゼと結合するが、色素によって結合に強弱があった。またオボアルブミンとは一部の色素でのみ結合がみられた。

V 結 論

1) 使用色素はすべて酸性色素で、タンパク質上の陽荷電基と結合に入るが、アルギニン残基のグアニジル基は塩結合に関与しない。また結合に際してタンパク質上の疎水基も重要で、タンパク質の荷電状態によっては、一部の色素ではこの疎水部位だけでも結合可能であった。さらに色素の結合はタンパク質の荷電状態だけでなく、これに起因するタンパク質の構造変化、或いはタンパク質の会合によっても影響を受けた。またタンパク質の種類によっても結合に大きな差異がみられた。

2) 使用色素は系統別にそれぞれ類似の骨格構造をもち、水酸基、スルホン基、メチル基その他の基の数や位置、ハロゲンの種類や数の差によって色の変化を出しているが、この僅かな差異がタンパク質との結合特に結合サイトの決定に大きな影響を与えることを明らかにした。

3) アゾ、ピラゾロンおよびトリフェニールメタン色素では、有害性とウシ血清アルブミンに対する最大結合数との間により相関があり、結合数の多い色素は食用として望ましくなく、結合数の多い理由は上記の関係から化学構造上推定できるようになった。

4) 結合の自由エネルギーは塩結合および疎水結合を含めたファンデルワールス力など2つの力が協同して働く場合に高く、1つの力が主で他の力が従的な場合に低かった。また複合体形成に伴うタンパク質の構造変化も、前者で強く後者で弱かった。

5) メタクロマジーが生成する一因として、ダイマー、モノマーの平衡状態にある色素では、タンパク質との結合がモノマーでおこるため、ダイマーが減少しモノマーが増加することを新しく推定した。このほか塩結合、疎水結合、ハロゲン—疎水基間の結合などによる電子の状態変化に伴う吸収スペクトルの変化によってもメタクロマジーが生成する。

またタンパク質と複合体を形成することによって、色素の耐光性が増加する場合や、退色が促進される場合のあることを明らかにした。

Table 1

Free Energies and Maximum Numbers for the Binding of Azo Dyes to Bovine Serum Albumin

Dyes	pH	Maximum number of bound anion per protein molecule	ΔF , cal/mole
Poncesu 3R	5.2	12	-7,140
	7.0	10	-7,020
	8.0	12	-7,480
	8.9	4	-6,720
	10.0	3	-6,600
Poncesu R	5.2	20	-7,840
	7.0	20	-7,110
	8.0	10	-6,920
	10.0	5	-6,440
	5.2	20	-6,590
Poncesu SX	7.0	20	-6,360
	8.9	6	-6,160
	5.2	10	-6,840
Amaranth	7.0	6	-6,310
	8.9	5	-6,150
	5.2	8	-6,640
Orange G	7.0	4	-6,480
	8.9	2	-6,430
	5.2	5	-6,940
New coccine	7.0	3	-6,610
	8.9	2	-6,440
	5.2	5	-7,130
Orange I	7.0	10	-6,440
	8.9	-	-5,790
	5.2	10	-7,240
Orange II	7.0	10	-6,930
	8.9	50	-6,550
	5.2	20	-6,740
Red 2G	7.0	6	-6,590
	8.9	5	-6,440
	5.2	7	-6,920
Red 6B	7.0	2	-6,710
	8.9	1	-6,690

Table 2

Relationship between Free Energies and Maximum Number for the Binding of Food Dyes to Bovine Serum Albumin at pH 7.0 and Permitted or Nonpermitted Dyes.

Dyes	Maximum number of bound dye per BSA molecule	ΔF , cal/mole
X Poncesu R	20	-7,110
X Poncesu SX	20	-6,360
X Poncesu 3R	10	-7,020
X Orange I	10	-6,440
X Orange II	10	-6,930
⊖ Red 2G	6	-6,590
○ Amaranth	6	-6,310
○ New coccine	3	-6,610
⊖ Red 6B	2	-6,710
⊖ Orange G	2	-6,480
X Guinea green	6	-6,850
X Light green	4 (20°)	-6,710
⊖ Yellow 2G	4 (10°)	-6,160
○ Fast green	4 (8°)	-6,360
○ Tartrezine	2	-6,100
○ Brilliant blue	2	-6,590
X Acid Violet	2	-7,450
○ Permitted dyes (in Japan)		
⊖ Permitted dyes (in G. B. and others)		
X Nonpermitted dyes		
* at pH 5.2.		

Table 3

Free Energies and Maximum Number for the Binding of Xanthene Dyes to Proteins

Dyes	pH	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)
Rose bengal	5.2	29	2		-7,600	-7,090	-9,080
	6.1			5			-9,120
	7.0	50	2	4	-7,800	-6,500	-8,900
	8.0			4			
	8.9	10			-7,540		
Erythrosine	12.0	10			-7,400		
	5.2	20	1		-7,930	-5,990	
	6.1			4			-8,420
	7.0	10	1	4	-9,180	-6,230	-8,610
	8.0			4			-8,470
Phloxine	8.9	10			-8,960		
	5.2	17	1		-7,780	-6,590	
	6.1			2			-8,620
	7.0	10	1	2	-7,510	-5,940	-9,010
	8.0			2			-8,730
Eosine	8.9	10			-6,890		
	12.0	5			-7,560		
	5.2	7	0.5		-8,130	-6,760	-8,530
	6.1			5			
	7.0	4	1	-	-7,790	-5,830	
	8.0			-			
	8.9	2			-7,910		

(A), Bovine serum albumin, (B), Bacterial α -amylase, (C), Trypsin.

Table 4

Free Energies and Maximum Number for the Binding of Pyrazolone and Triphenylmethane Dyes to Bovine Serum Albumin

Dyes	pH	Maximum number of bound dye per BSA molecule	ΔF , cal/mole
Tartrezine	5.2	3	-6,790
	7.0	2	-6,100
	8.9	2	-5,590
Yellow 2G	5.2	10	-6,460
	7.0	4	-6,150
	8.9	1	-5,900
Guinea green	5.2	8	-7,040
	7.0	6	-6,850
	8.9	20	-6,610
Light green	5.2	20	-6,500
	7.0	4	-6,710
	8.9	7	-6,340
Fast green	5.2	8	-6,720
	7.0	4	-6,360
	8.9	2	-6,270
Brilliant blue	5.2	3	-7,030
	7.0	2	-6,590
	8.9	2	-6,770
Acid Violet	5.2	3	-6,360
	7.0	2	-7,450
	8.9	2	-6,600

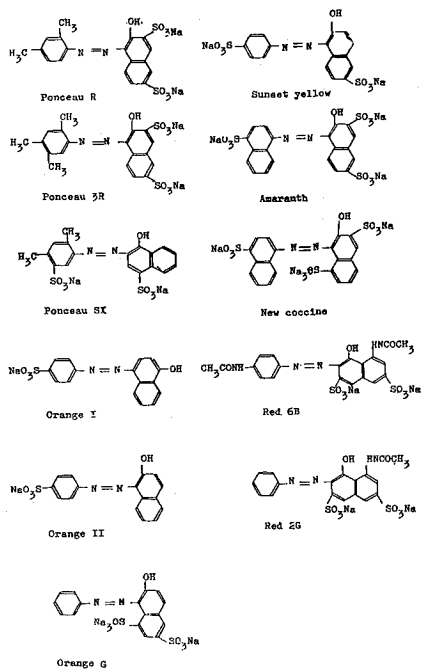


Fig. 1 Chemical Structure of Azo Dyes.

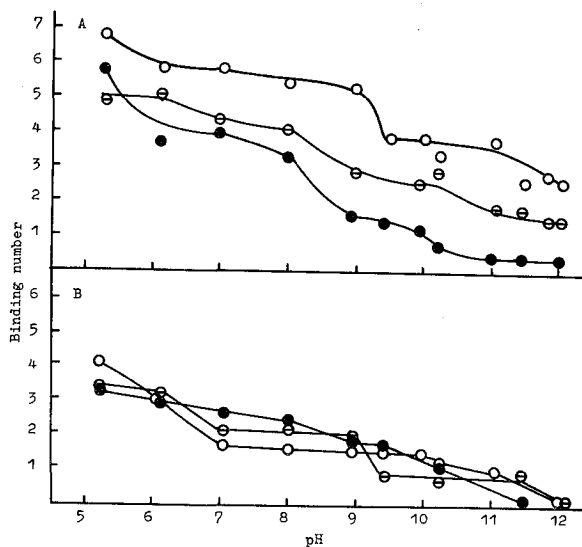


Fig. 2 Binding of Azo Dyes to Bovine Serum Albumin.
A. ○, Ponceau R; ◐, ponceau 3R; ●, ponceau SX.
B. ○, Amaranth; ◐, new coccoline; ●, sunset yellow.

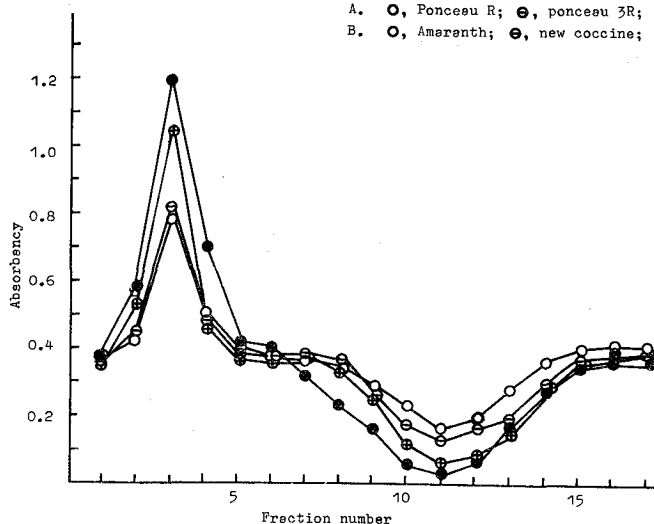


Fig. 3 Gel-Filtration Chromatography of Native, Urea(8M), Ponceau 3R (10^{-5} M) and Amaranth(2×10^{-5} M) Treated Bovine Serum Albumin on a Sephadex G-150 Column Equilibrated by Rose bengal.
○, Native bovine serum albumin (BSA); ●, urea treated BSA; ◐, ponceau 3R treated BSA; ◑, amaranth treated BSA.

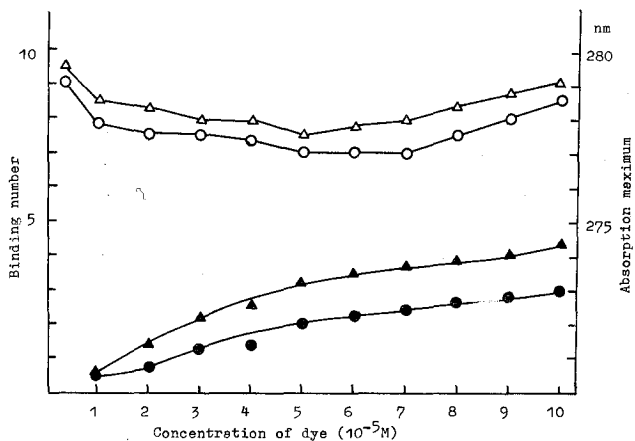


Fig. 4 Relationship between Binding Number and Shift of Absorption Maximum of UV Absorption Spectra on of Ponceau R - Bovine Serum Albumin or -Human Serum Albumin Systems.

○, Absorption maximum of BSA; △, absorption maximum of HSA; ●, binding number for BSA; ▲, binding number for HSA.

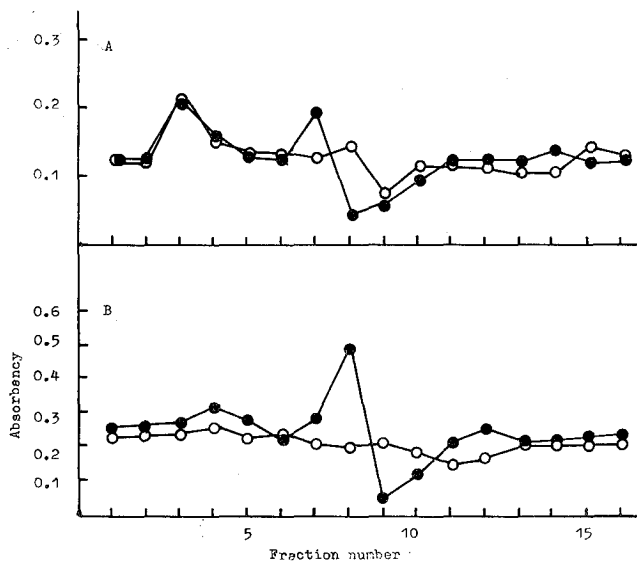


Fig. 5 Gel-Filtration Chromatography of Native and Urea Treated Bovine Serum Albumin on a Sephadex G-150 Column Equilibrated by Ponceau 3R or Amaranth. A, Ponceau 3R ($2 \times 10^{-5}M$); B, Amaranth ($5 \times 10^{-5}M$)
○, Native bovine serum albumin; ●, 8M urea treated bovine serum albumin.

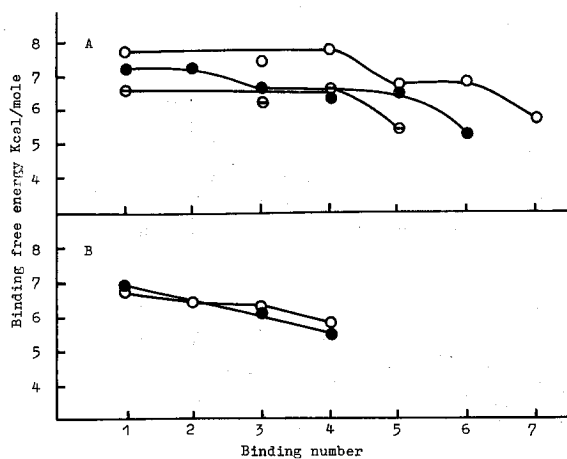


Fig 6 Free energy changes in the formation of protein-dye complex as a function of number of absorbed dye at pH 5.2.
 A. ○, Ponceau R; ●, ponceau 3R; ○, ponceau SX.
 B. ○, Ameranth; ●, new coccine.

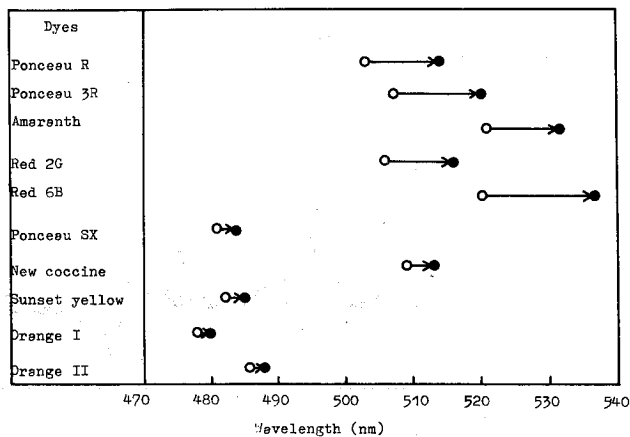


Fig. 7 Migration of the Absorption Maximum of the Azo Dyes by the Addition of Bovine Serum Albumin at pH 7.0.

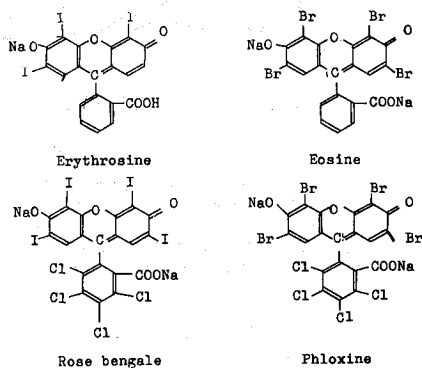


Fig. 8 Chemical Structure of Xanthene Dyes.

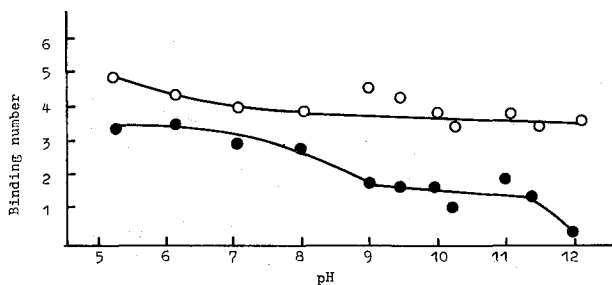


Fig. 9 Binding of Rose Bengal and Erythrosine to Bovine Serum Albumin.

○, Rose bengal; ●, erythrosine.

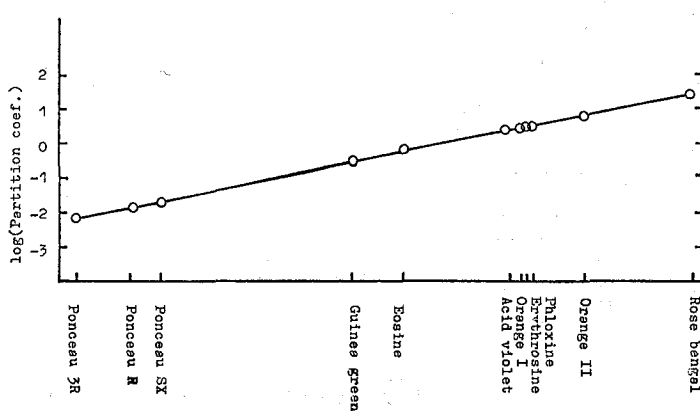


Fig. 10 Partition Coefficient of Food Dyes for n-Octanol

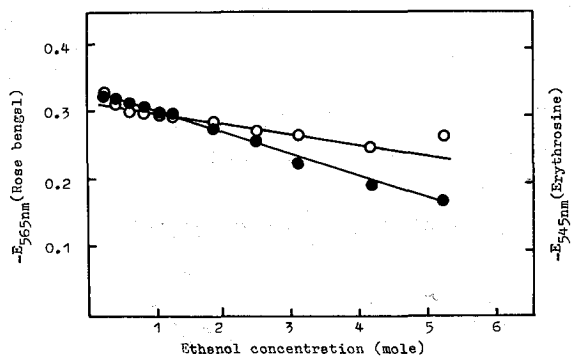


Fig. 11 Inhibition by Ethanol on the Binding of Rose Bengal or Erythrosine to Bovine Serum Albumin at pH 5.2.

○, Erythrosine; ●, rose bengal.

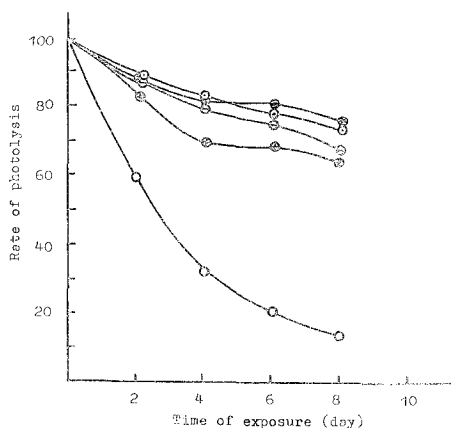


Fig. 13 Photolysis of Rose Bengal.

○, In the absence of bovine serum albumin(BSA); ●, $1.43 \times 10^{-5}M$, ○, $1.07 \times 10^{-5}M$, ○, $0.72 \times 10^{-5}M$, ○, $0.36 \times 10^{-5}M$ (concentration of BSA)

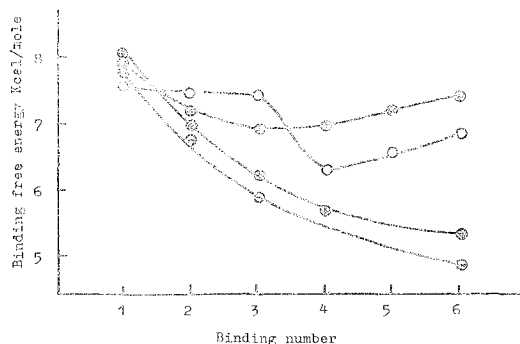
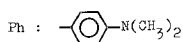
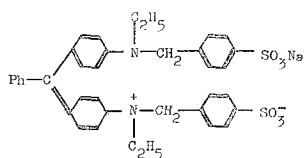
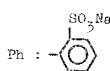


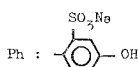
Fig. 12 Free energy changes in the formation of protein-dye complex as a function of number of absorbed dye at pH 5.2.
○, Rose bengal; ●, Phloxine; ⊙, Erythrosine; ⊗, Eosine.



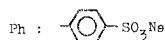
Acid violet 6B



Brilliant blue FCF



Fast green FCF

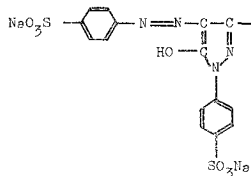


Light green SF yellowish



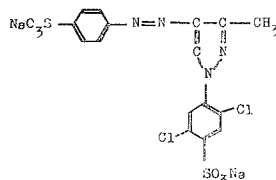
Guinea green B

Triphenylmethane dyes



Tertrezine

Pyrazolone dyes



Yellow 2G

Fig. 14 Chemical Structure of Triphenylmethane and Pyrazolone Dyes.

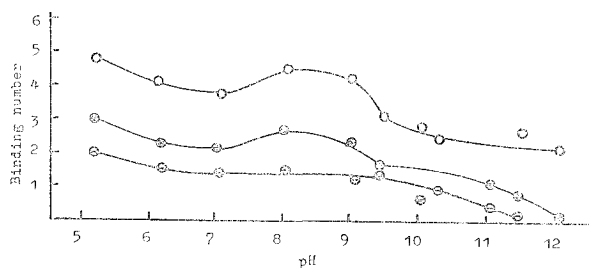


Fig. 15 Binding of Guinea Green, Light Green and Brilliant Blue to Bovine Serum Albumin.

○, Guinea green; ⊙, light green; ⊗, brilliant blue.

本研究の関連論文

- 1) 相沢秀俊, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅱ), 食衛誌, Vol. 8, 40 (1967)
- 2) 相沢秀俊, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅴ), 食衛誌, Vol. 8, 387 (1967)
- 3) 相沢秀俊・半沢史子, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅵ), 食衛誌, Vol. 8, 391 (1967)
- 4) 相沢秀俊, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅶ), 栄養と食糧, Vol. 22, 231 (1969)
- 5) 相沢秀俊・武山いよ子, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅷ), 栄養と食糧, Vol. 22, 235 (1969)
- 6) 相沢秀俊, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅸ), 栄養と食糧, Vol. 22, 239 (1969)
- 7) 相沢秀俊・渡辺歌子, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅹ), 栄養と食糧, Vol. 23, 311 (1970)
- 8) 相沢秀俊, タンパク質と食用色素の結合 (Ⅺ), 栄養と食糧, Vol. 23, 319 (1970)
- 9) H. Aizawa, Interaction of Food Colors with Protein Part Ⅲ. J. Food Hyg. Soc. Japan, 12, 81 (1971)
- 11) 相沢秀俊, タンパク質と食用色素の結合 I, Ⅲ, IV, ⅩⅢ, ⅩⅣ は福島大学教育学部理科報告 (1965~1971)

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、食用色素として主に使用されているアゾ、キサントン、ピラズロンおよびトリフェニールメタン系色素について、血清アルブミンなどの蛋白質との結合反応の性質を詳細に検討し、食用色素の化学構造と蛋白質結合との関連性、ひいては食用色素の有害性を考察する上での基礎的知見を確立しようとする目的のもとに行われたものである。

色素と蛋白質の結合様式は、基本的には2つの力、すなわち、スルホン基、カルボキシル基などによる色素の陰荷電基と、蛋白質のイミダゾール基、ε-アミノ基などの陽荷電基との間の塩結合、および疎水結合である。両結合の寄与の割合により、各色素の結合の性質を表し得ることを示した。

色素と蛋白質の結合の自由エネルギーと最大結合数の測定を行い、色素の化学構造との関連性を明らかにした。また、結合の自由エネルギーおよび結合数の大きい色素は、一般に有害性も大きく使用禁止になっている色素が多いことを示した。

色素結合による蛋白質の構造変化の誘導について、紫外外部吸収スペクトルおよび蛍光分析により検討し、色素の変性作用は、塩結合と疎水結合の両結合力に依存性の高い色素で著しいことを明らかにした。

色素-蛋白質複合体のメタクロマジーについてその機構を解析し、色素分子がダイマーとモノマーの平衡状態にある系では、色素の結合はモノマーで進行するためダイマーが減少し、メタクロマジーの現象が起るとする新しい考え方を提出した。このほか、塩結合、疎水結合、ハロゲン-疎水基間などの結合によるメタクロマジーの生成についても明らかにした。

以上のように、食用色素と蛋白質の結合の性質について組織的に研究し、多くの新しい知見を得たことは、農学分野特に食品科学の領域において寄与するところ大きく、著者に農学博士を授与するに充分な価値があるものと判定する。